

Aus dem Anatomischen Institut (Lehrstuhl I) der
Philipps-Universität Marburg a.d. Lahn
(ehem. Leiter: Prof. Dr. med. J.W. Rohen)

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
WIRKUNG VON KALLIKREIN AUF DIE MITOSERATE
DES DARMEPITHEL DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

MARGIT HINTZ, geb. Hensiek

aus Buer

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Anatomischen Institut (Lehrstuhl I) der
Philipps-Universität Marburg a.d. Lahn
(ehem. Leiter: Prof. Dr. med. J.W. Rohen)

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
WIRKUNG VON KALLIKREIN AUF DIE MITOSERATE
DES DARMEPITHEL DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

MARGIT HINTZ, geb. Hensiek

aus Buer

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Medizinischen Fachbereich
der Philipps-Universität Marburg am 11. März 1977
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof.Dr.med.F.Neurath
Referent: Prof.Dr.med.J.W.Rohen
Korreferent: Prof.Dr.med.D.O.Schachtschabel

Inhaltsübersicht

	Seite
A. Einleitung	4
B. Material und Methodik	5
Biomikroskopische Untersuchungen des Rattendarmepithels	
C. Ergebnisse	
1. Verhalten bei Normaltieren	8
2. Verhalten nach Pankreasausschaltung	10
3. Vergleichsversuche mit Colcemid	11
a, Reiner Colchizineffekt nach intra- luminaler und intraperitonealer Appli- kation	11
b, Gleichzeitige Colcemid- und Kalli- krein-Applikation	13
c, Colchizin- und Kallikreineffekte nach Pankreasgangunterbindung	16
D. Diskussion	19
E. Zusammenfassung	25
F. Literatur	27

Einleitung

Seit E.K.Frey und H.Kraut 1925 im Urin eine blutdrucksenkende, physiologisch hochaktive Substanz, die später Kallikrein oder Kininogenase genannt worden ist, entdeckt hatten, und seit Werle zeigen konnte, daß diese Substanz nicht direkt, sondern durch Freisetzung eines Mediatorstoffes, der später den Namen Kinin erhielt, wirkt, ist das wissenschaftliche Interesse an diesem sogenannten Kallikrein-Kinin-System des Organismus ständig gewachsen. Inzwischen liegen so viele Befunde vor, daß man annehmen kann, daß dieses System von genereller Bedeutung für die Regulation von Austauschvorgängen im Gewebe ist. 1971 entdeckten Rixon und Mitarbeiter, daß Kininogenasen einen deutlich stimulierenden Effekt auf die DNS-Synthese und die Mitoserate stark proliferierender Gewebe, wie z.B. Knochenmark und Thymus, haben. Auch Mandel und Mitarbeiter (1973) beobachteten, daß Kallikrein bei lokalen, durch Röntgenbestrahlung erzeugten Hautschäden, oder nach Ganzkörperbestrahlung einen, die Regeneration auf zellulärer Ebene, fördernden Effekt hat.

Es lag daher nahe, die Wirkung der Kininogenasen auf die Proliferation epithelialer Gewebe erneut zu prüfen. Dafür scheint das Modell des Darmepithels, dessen Zellzyklus genau bekannt ist und quantitativ leicht erfaßt werden kann, besonders geeignet. Wie die erhobenen Befunde zeigen, eignet sich dieses Modell besonders gut für die genannte Fragestellung, da der Zellumsatz relativ groß und das System für exogene Einflüsse sehr empfindlich ist.

Material und Methodik

Untersucht wurden ausschließlich erwachsene Sprague-Dawley-Ratten gleicher Gewichts- und Altersklassen (Körpergewicht 250-300 g). Für jeden Versuch wurden mindestens 8-10 Tiere und die gleiche Anzahl von Kontrolltieren verwendet. In leichter Äther- bzw. Nembutal-Narkose erhielten die Tiere reines Schweinepankreas-Kallikrein ^{1x} in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, entweder intraperitoneal oder intraluminal injiziert. Die intraluminale Injektion wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle in das Duodenum durch einen kleinen Kunststoffschlauch vorgenommen. Die Kallikreindosen variierten in den verschiedenen Versuchsserien zwischen 3, 10, 50 und 100 Einheiten pro 100 g Körpergewicht. Den Kontrolltieren wurde die gleiche Menge physiologische Kochsalzlösung (1 ml) injiziert.

Die Ausschaltung des Pankreas erfolgte in einer Voroperation in Nembutalnarkose in folgender Weise: Einlegen eines Kunststoffschlauches in den Ductus choledochus in Lebernähe, Einführung des Schlauches in das obere Duodenum und vollständige Unterbindung des unteren Ductus choledochus in Nähe des Darms. Dadurch wird der Abfluß des Pankreassaftes vollständig unterbrochen und das exogene Pankreas ausgeschaltet. Histologische Kontrollen zeigten, daß das Pankreasdrüsengewebe rasch degeneriert und durch Fettgewebe ersetzt worden war. Tiere, bei denen postoperativ eine Gallenstauung oder ein Ikterus aufgetreten war, wurden eliminiert.

^{1x} Der Fa. Bayer AG danken wir für die freundliche Überlassung der hochgereinigten Kallikreinpräparate

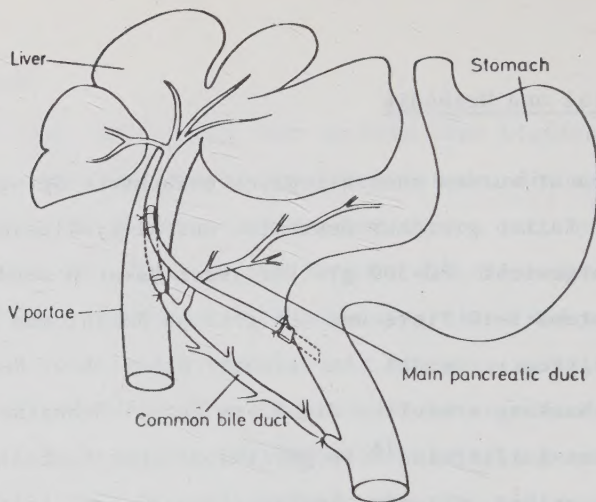


Abb. 1

Schema über die Pankreasausschaltung durch Unterbindung des Ductus choledochus bei der Ratte-nach P.F. Matthiessen und J.W. Rohen (1975)

Bei einer 3. Versuchsserie wurden kurz nach der intra-peritonealen oder intraluminalen Injektion der Versuchssubstanzen zusätzlich 1 mg/kg KG Colcemid (Colchizin) injiziert, um die Zahl der Mitosen im Darm zu steigern. Bekanntlich blockiert Colchizin die Mikrotubuli des Spindelapparates, so daß die Mitosen in der Metaphase stehenbleiben. 4 Stunden später wurde die Colzemid-Injektion wiederholt, wenn die Tiere nicht eine oder zwei Stunden, sondern zu einem späteren Zeitpunkt getötet werden sollten. Kleine Gewebstückchen, jeweils aus dem Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon wurden in Vollnarkose entnommen und in Stieve'scher Fixationslösung fixiert. Bei der Gewebsentnahme wurde streng darauf geachtet, daß die Lokalisation der zu untersuchenden Darmstückchen immer gleich war. Die Stücke wurden über die Alkoholreihe entwässert, in Paraffin- Paraplast

eingebettet und in der für die Lichtmikroskopie üblichen Weise geschnitten und gefärbt. Folgende Färbungen wurden durchgeführt:

1. van Gieson-Färbung, 2. Eisenhaematoxylin nach Heidenhain, 3. Azan-Färbung.

Die immer in gleicher Weise orientierten histologischen Schnitte wurden mit dem Wild'schen Forschungsmikroskop (M 20) quantitativ ausgewertet. Dabei wurde der Zeichenaufsatz benützt und bei einer Vergrößerung von 200- sowie 600-fach in einem vorgegebenen Quadrat von 100 μ Seitenlänge, dessen Basis immer genau an der Muscularis mucosae anlag, die Zahl der Mitosen bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, daß immer nur gleich dicke und gut orientierte Schnitte (Zotten und Krypten im Längsschnitt) ausgewertet wurden.

Die statistische Sicherung der Befunde wurde sowohl nach dem Student-Test als auch nach dem U-Test von Mann und Whitney vorgenommen.

Ergebnisse

Die zahlreichen Versuchsserien können in 3 Gruppen zusammengefaßt werden, die nachfolgend beschrieben werden sollen.

1. Versuchsgruppe (Verhalten bei Normaltieren)

Die 1. Gruppe von Versuchen beschäftigt sich einmal mit der Frage des reinen Kallikrein-Effektes auf die Mitosehäufigkeit im Epithel der 4 Hauptabschnitte des Darmes (Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon); sowie zum anderen mit dem zeitlichen Aspekt dieser Wirkung und der Dosisabhängigkeit.

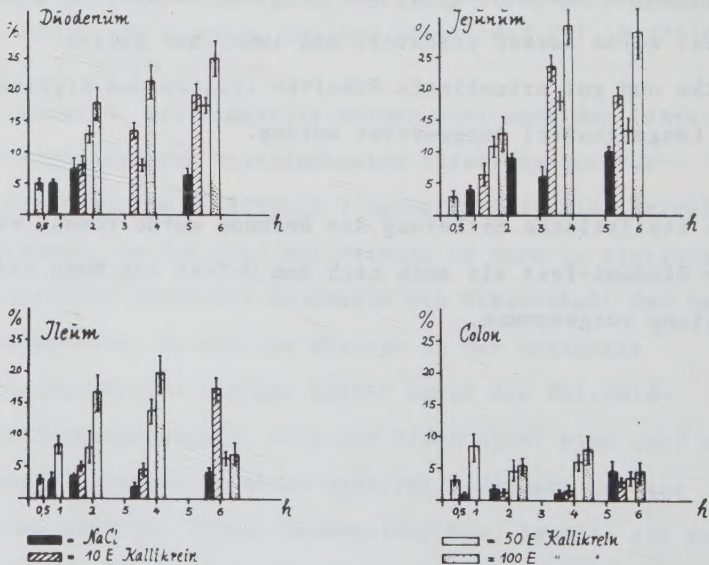


Abb. 2

Mitoserate im Dünn- und Dickdarm nach Injektion von 10, 50 und 100 Einheiten Kallikrein bei intraluminaler Applikation.

In mehreren Versuchsreihen wurde Kallikrein in einer Dosis von 10, 50 oder 100 Einheiten pro Tier, und zwar intraluminal nach operativer Eröffnung der Bauchhöhle in 1ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst, verabreicht. Die Tiere blieben 1/2 - 6 Stunden am Leben und wurden anschließend getötet. Für jede Zeitspanne wurde eine Versuchsgruppe mit je 6 Tieren und je 6 Kontrolltieren verwendet. Es zeigte sich, daß die Mitoserate nach Kallikreingaben von 50-100 Einheiten in allen Darmabschnitten signifikant ansteigt (Abb. 2). Der Effekt erreicht sein Maximum nach 4-6 Stunden. Er ist im Colon, in dem ohnehin die Mitoserate relativ niedrig ist, sehr gering und teilweise auch nicht signifikant. Die Effekte sind im oberen Dünndarm, vor allem im Jejunum und Duodenum, sehr ausgeprägt. Generell ist die Wirkung des Kallikreins bei Gaben von 100 Einheiten am stärksten. Die Versuche mit 10 Einheiten zeigten meist keine signifikanten Effekte. Generell zeichnet sich bei den gewählten Dosen eine Tendenz zu steigenden Mitosezahlen bei den jeweils höheren Dosen ab.

Ähnliche Effekte wie nach intraluminaler Applikation ließen sich auch nach intravenöser und intraperitonealer Applikation beobachten. Wir haben jedoch die diesbezüglichen Versuchsserien nicht statistisch ausgewertet, so daß sie an dieser Stelle nicht genauer erwähnt werden sollen.

2. Versuchsgruppe (Verhalten nach Pankreasausschaltung)

Um die endogene Sekretion von Praekallikrein und Kallikrein in den Dünndarm durch das Pankreas auszuschalten, wurde bei diesen Versuchsserien der Ductus choledochus unterbunden und damit das Pankreas zur Degeneration gebracht. 8 Tage nach der Operation zeigte sich bei den Kontrolltieren eine geringe Verminderung der Mitoserate im gesamten Darm, im Vergleich mit den Durchschnittswerten bei Normaltieren etwa um die Hälfte.

Nach intraperitonealer Gabe von 30 Einheiten Kallikrein zeigt sich schon nach 1 Stunde eine deutliche, jedoch nicht immer signifikante Zunahme der Mitosenhäufigkeit in verschiedenen Darmabschnitten, die sich allerdings in den nächsten Stunden so stark steigert, daß sie signifikant wird. Nach 4-6 Stunden erreicht der Effekt sein Maximum (Abb. 3).

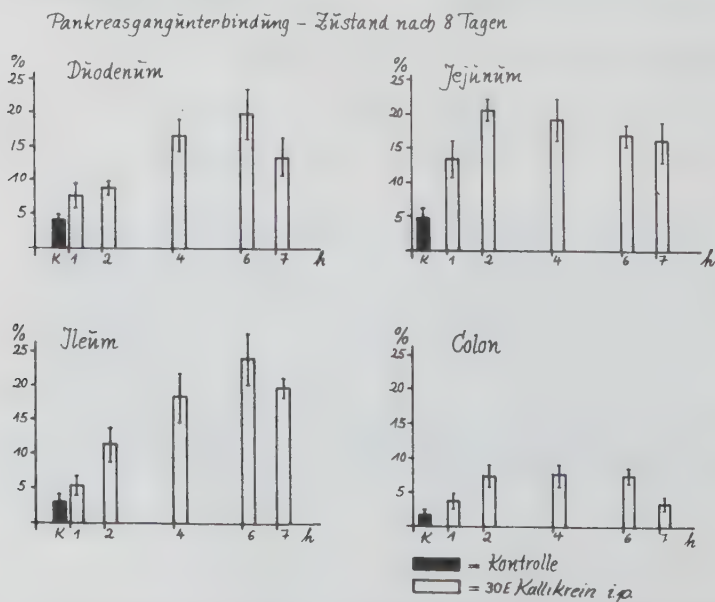


Abb.3 Mitoserate im Dünn- und Dickdarm nach Pankreasgangunterbindung und intraperitonealer Injektion von 30 Einheiten Kallikrein. Zustand nach 8 Tagen.

Ähnlich wie bei den Versuchen ohne Pankreasgangunterbindung sind auch hier die Effekte im Colon wesentlich geringer. Bei allen Darmabschnitten sind die 7-Stunden-Werte geringer als die 6-Stunden-Werte, d.h. die Wirkung des Enzyms beginnt abzuklingen. Nach intraperitonealer Kallikreingabe liegen die Mitoseraten in diesen Versuchsserien durchschnittlich zwischen 15 und 25%, d.h. etwa in derselben Größenordnung wie bei den Normaltieren nach Kallikreinapplikation. Man kann also sagen, daß das Enzym die durch die Operation reduzierte Mitoserate wieder zu ähnlichen Werten zurückbringt, wie sie bei Normaltieren durch Kallikreinstimulation zu erreichen waren.

3. Versuchsgruppe (Vergleichsversuche mit Colcemid)

In diesen Serien wurde versucht, durch Injektion von Colchizinpräparaten (Colcemid, Ciba ^{1x}), die Zahl der Mitosen im Darmepithel zu steigern, um dadurch die beobachtete Enzymwirkung deutlicher zu machen. Das Überraschende dabei war allerdings, um das Ergebnis vorwegzunehmen, daß nach Gaben von Colcemid der Kallikrein-Effekt gegenüber den Kontrollen nicht mehr signifikant war.

a. Reiner Colchizineffekt nach intraluminaler und intraperitonealer Applikation

In einer ersten Versuchsserie wurde Colcemid in einer Dosis von 0,1 mg/100 g KG 1 Stunde vor Tötung der Tiere einmal intraperitoneal und in einer weiteren Serie intraluminal injiziert. Wie Abb. 4 zeigt, steigt die Häufigkeit der Mitosen im oberen Dünndarm (Duodenum und Jejunum)

^{1x} Der Fa. Ciba-Geigy, Basel, danken wir für die freundliche Überlassung der Versuchssubstanzen

durchschnittlich um 12-20 % an; ein Effekt, der bereits nach 1 Stunde deutlich in Erscheinung tritt, aber nach 2-4 Stunden sich noch etwas vergrößert hat, um nach 6 Stunden dann wieder etwas geringer zu werden. Intraperitoneale und intraluminale Applikationen von Colcemid führen im Duodenum und Jejunum - auch im Colon, wo die Werte ja generell sehr niedrig sind - zu ähnlichen Daten. Nur im unteren Dünndarm (Ileum) weichen sie stärker voneinander ab. Hier ist die Mitosehäufigkeit nach intraluminaler Applikation von Colcemid wesentlich niedriger. Das mag damit zusammenhängen, daß die Lösung in das Duodenum injiziert worden ist und dadurch der untere Dünndarm nur zum Teil oder gar nicht von der Substanz erreicht worden ist. Auch die zeitliche Komponente scheint in diesem Darmabschnitt, im Gegensatz zu den anderen Dünndarmregionen, deutlicher hervorzutreten.

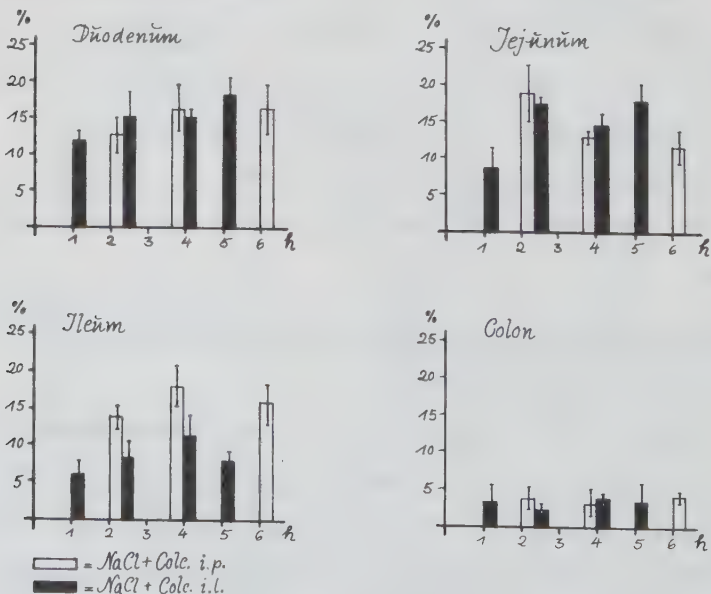


Abb. 4 Mitosehäufigkeit im Dün- und Dickdarm nach einmaliger Injektion von Colcemid intra- oder intraperitoneal appliziert.

b. Gleichzeitige Colcemid- und Kallikrein-Applikation

In diesen Versuchsserien, in denen wiederum jeder Stundenwert durch eine eigene Versuchsgruppe von mindestens 6 Albinoratten repräsentiert ist, sollte die Kallikreineinwirkung mit der Colchizinwirkung verglichen werden. Bei den über 6 und 8 Stunden ausgedehnten Versuchen wurde Colcemid 4 Stunden nach der 1. Applikation noch ein 2. Mal und zwar in gleicher Dosis und Konzentration injiziert (schwarze Pfeile in Abb. 5). Auch in diesen Versuchen zeigte sich wiederum im Prinzip ein ähnliches Bild, wie es von dem reinen Colcemid-Versuch bekannt war. Das Maximum der Vermehrung der Mitosezahlen nach Colchizingaben liegt auch hier wiederum bei 4 Stunden und klingt nach 6-8 Stunden allmählich ab. Jedoch ist der Abfall nicht so ausgeprägt, da die 2. Colcemid-Injektion das rasche Abklingen der Wirkung vermutlich verhindert hat. Kallikrein wurde in der 1. Serie in sehr kleinen Dosen (3 Einheiten i.p.), in der 2. Versuchsserie in etwas größeren Dosen (10 Einheiten i.p.) und in der 3. Serie schließlich in einer Dosis von 50 Einheiten i.p. gegeben (Abb. 5-7).

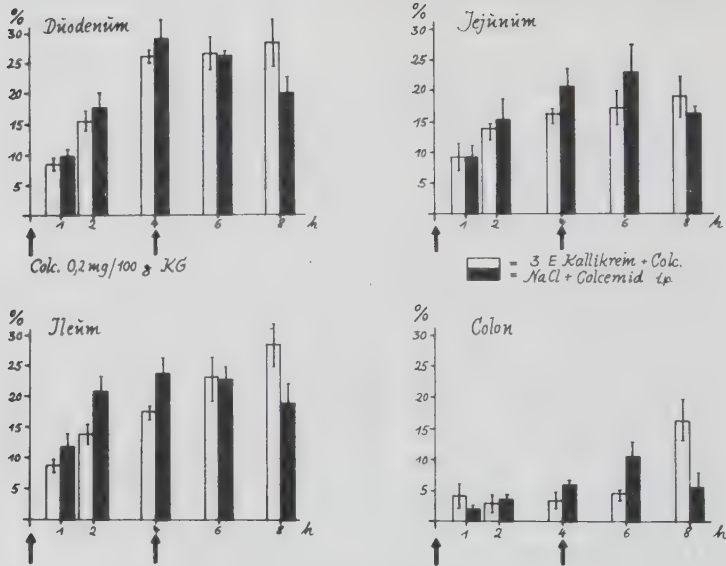


Abb. 5 Mitoserate im Dünn- und Dickdarm nach Injektion von 3 Einheiten Kallikrein + Colcemid oder Kochsalz + Colcemid intraperitoneal. Colcemid wurde in einer Dosis von 2 mg/kg KG appliziert.

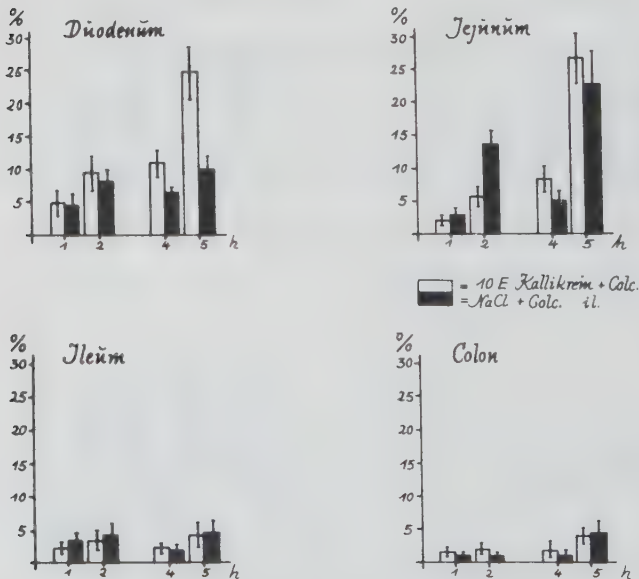


Abb. 6 Mitoserate im Dünn- und Dickdarm nach 10 Einheiten Kallikrein + Colcemid oder Kochsalz + Colcemid, intraluminaler Applikation

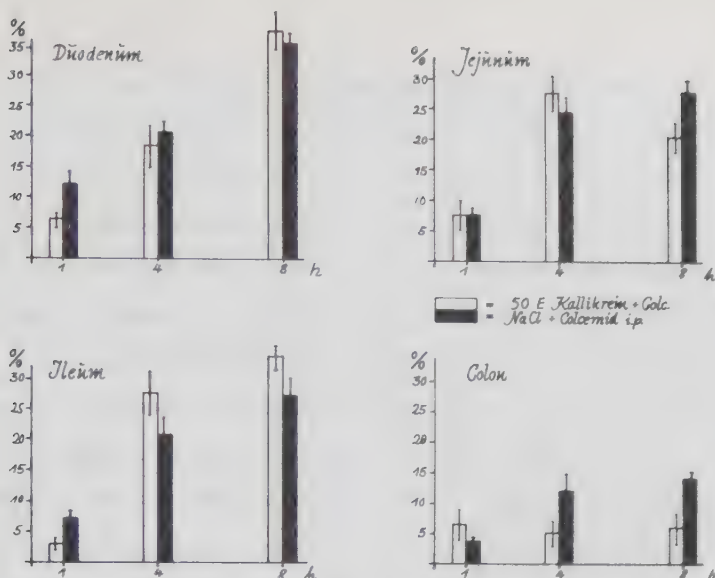


Abb. 7 Mitoserate im Dünn- und Dickdarm nach Injektion von 50 Einheiten Kallikrein + Colcemid i.p. Kontrolle: Kochsalz + Colcemid i.p. in zeitlichen Abständen von 1, 4, 6 und 8 Stunden. Näheres siehe Text.

In der Serie mit 3 Einheiten Kallikrein tritt ein signifikanter mitogener Effekt nur im Duodenum, Ileum und Colon bei den 8-Stunden-Versuchen auf (Abb. 5). Die übrigen Werte weichen nicht wesentlich voneinander ab, so daß die Häufigkeit der Mitosen bei den mit Colcemid behandelten Tieren etwa gleich groß ist wie bei den mit Kallikrein behandelten Tieren. Lediglich die Verlaufskurven weichen etwas voneinander ab. Nach Colcemidgaben ergibt sich ein deutliches Maximum bei 4 Stunden in allen Darmabschnitten, während die Kallikrein-Tiere eine deutlich ansteigende Tendenz im Hinblick auf die Mitosezahlen aufweisen. Auffallend sind die hohen Werte beim Colon nach 6-8 Stunden, für die wir keine unmittelbare Erklärung haben.

In einer zweiten Versuchsserie wurden 10 Einheiten Kallikrein, diesmal intraluminal appliziert, zusammen mit Colcemid. Hier ergaben sich nur sehr niedrige Werte beim Ileum und Colon, was sich wahrscheinlich wiederum daraus erklärt, daß die injizierten Lösungen den unteren Dünn- und Dickdarm nicht in genügender Konzentration erreicht haben. Wieder zeigt sich ein signifikanter Effekt von Kallikrein auf die Mitoserate nur bei den 5-Stunden-Werten des Duodenums. Im übrigen sind die Kallikreinwerte mit denen der Kontrollen annähernd gleich. (Abb. 6)

In der 3. Versuchsserie wurden schließlich 50 Einheiten Kallikrein pro Tier zusammen mit Colcemid intraperitoneal injiziert. Beim Duodenum und Ileum beobachtet man wieder eine ansteigende Tendenz, beim Jejunum und Colon allerdings nicht. Keiner der Werte weichen signifikant voneinander ab, obwohl auch bei diesem Versuch bei den 8-Stunden-Werten eine gewisse Tendenz zu einer höheren Mitosehäufigkeit in einigen Darmabschnitten zu erkennen ist.

c. Colchizin- und Kallikreineffekte nach Pankreasgangunterbindung

In einer letzten Versuchsserie sollte schließlich geprüft werden, wie sich die beobachteten Colcemid- und Kallikreineffekte bei Tieren darstellen, bei denen 8-18 Tage vorher eine Pankreasgangunterbindung vorgenommen worden war (Abb. 8). Insgesamt wurden in dieser Gruppe 4 Serien mit je 10 Tieren durchgeführt. Obwohl einige Tiere an den Folgen der Operation starben, blieben in jeder Gruppe doch meist noch 6-8 Tiere für die stati-

stische Auswertung übrig. Es zeigte sich auch hier der schon oben beschriebene Effekt, daß nämlich Kallikrein bei Pankreasgang-unterbundenen Tieren die gesunkene Mitoserate des Darmes wieder anzuheben vermag, wenn auch die Werte bei diesen Versuchen generell etwas niedriger liegen als bei den früheren. Der Kallikrein-Effekt erscheint besonders im Jejunum groß, ist aber auch in den anderen Darmabschnitten deutlich. Interessanterweise liegt er aber generell nicht über den Colcemid-behandelten Tieren, was ja mit den Befunden der vorhergehenden Versuchsgruppe übereinstimmt. Die Injektion von Colcemid in Dosen von 1-2 mg/kg Körpergewicht steigert die Mitosehäufigkeit in gleicher Weise wie die Applikation von Kallikrein in Dosen von 30 Einheiten pro Tier am 11. oder 14. Tag nach der Operation.

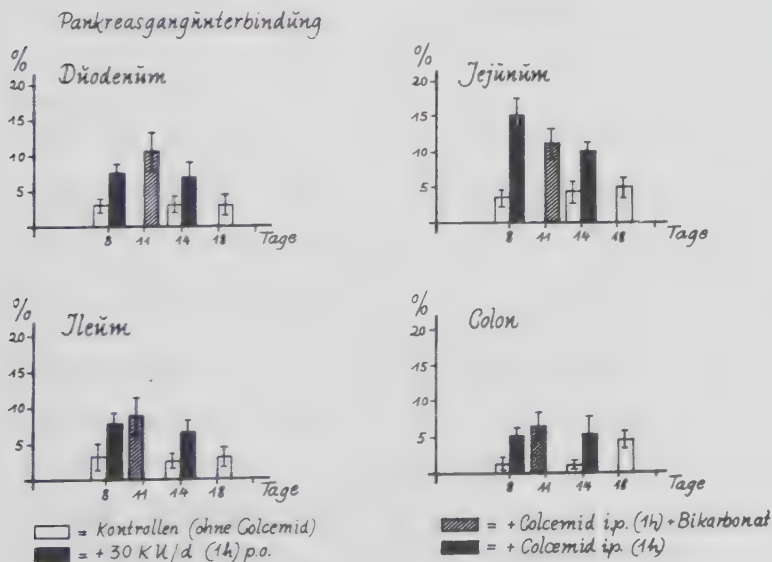


Abb. 8 Mitosenhäufigkeit im Darmepithel 8-18 Tage nach Pankreasausschaltung und Kallikreingaben (Näheres s. Text)

Colcemid- und Kallikreinwerte sind signifikant verschieden von den Kontrollen, nicht aber untereinander signifikant verschieden. Geprüft wurde schließlich auch noch, ob eine Übersäuerung des Darmes bei diesen Effekten eine Rolle spielt. Deshalb wurde bei einer Versuchsserie zusätzlich Bikarbonatlösung per os verabreicht. Signifikante Unterschiede ließen sich jedoch damit nicht erzielen. Auch nach intraluminaler Applikation von Kallikrein bzw. Kochsalzlösung mit oder ohne Colcemid ergaben sich keine Unterschiede, wenn zusätzlich Bikarbonat verabreicht worden war. Diese Befunde sprechen dafür, daß der pH-Wert im Darm bei den geschilderten Eingriffen keine wesentliche Rolle spielt und die Häufigkeit der Mitoserate dadurch kaum beeinflusst wird.

Diskussion

Kallikrein gehört zu den Kininogenasen und stellt ein proteolytisches Enzym dar, das aus Schweinepankreas gewonnen wird und in 2 Formen (A und B) auftritt (Kutzbach et al. 1972, Fiedler et al. 1972). In den üblichen Präparationen sind beide Formen gemischt enthalten. Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften wenig, sondern nur in der Stellung ihrer Kohlenhydratanteile. Kininogenasen sind im Organismus weit verbreitet und zwar kommen sie sowohl in verschiedenen Organen (Glandula parotis, Gl. submandibularis, Pankreas und Niere) als auch im Plasma und anderen Körperflüssigkeiten (Urin, Speichel) vor. Das Gewebeskallikrein hat ein Molekulargewicht von 26.000, während das Plasmakallikrein höhermolekular ist (ungefähr 90.000). Das Plasmakallikrein spielt eine Rolle bei den Gerinnungsvorgängen (zwischen Plasmakallikrein und dem Hagemann-Faktor wurde ein Feedback-mechanismus gefunden), das Pankreaskallikrein bei den Verdauungsvorgängen und der Zirkulation (Vasodilatation in der Peripherie), und das Nierenkallikrein soll für die Regulation der Elektrolytkonzentration wichtig sein. Die funktionellen Zusammenhänge zwischen Kininogenasen und Kininen stellt man sich heute nach dem in Abb. 9. wiedergegebenen Schema vor (Frey et al. 1968, Erdös et al. 1970). Aktives Kallikrein aus den Nieren oder Speicheldrüsen kann aus Kininogenasen freigesetzt werden.

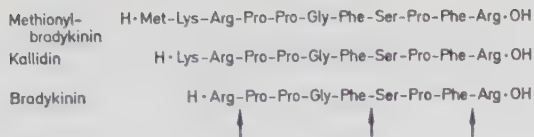


Abb. 10 Aminosäuresequenzen der Kinine. Die Pfeile deuten auf die durch Kininasen spaltbaren Peptidbindungen (nach H. Fritz, 1975).

Durch Kininasen kann die Aminosäuresequenz an verschiedenen Stellen gespalten und damit die Kininwirkung aufgehoben werden (Abb.10). Das aus Schweinepankreas gewonnene hochgereinigte Pankreaskallikrein besitzt als proteolytisches Enzym eine sehr begrenzte Substratspezifität. Es setzt rasch Kinine aus dem Kininogen frei, ohne dabei andere Proteine anzugreifen. Da im Organismus keine Inhibitoren im nennenswerten Maße vorhanden sind, hält seine Wirkung relativ lange an.

Die genaueren funktionellen Zusammenhänge dieser Substanzen im Rahmen des Gewebestoffwechsels sind jedoch bis heute immer noch wenig aufgeklärt, obwohl zahlreiche Einzeleffekte bekanntgeworden sind. Eine besonders wichtige Beobachtung stellt die von Rixon et al. (1971, 1973) über den proliferationsfördernden Effekt der Kininogenasen dar. Wie die hier erhobenen Befunde zeigen, kann dieser Effekt auch für das Darmepithel bestätigt werden.

Bekanntlich befindet sich das Darmepithel in einem ständigen Erneuerungswechsel (Zellzyklus), der von den Krypten unterhalten wird. Nach Injektion von tritium-markiertem Thymidin oder anderer Tracer-Substanzen sieht man eine Wanderung markierter Zellen vom Boden der Krypten bis zu den Spitzen der Zotten, die bei Ratten etwa 36 Stunden dauert und mit einer Zelldifferenzierung einhergeht. Leblond et al. (1948, 1956) waren die ersten, die diese, inzwischen vielfach bestätigte Zellbewegung erkannt und quantitativ analysiert haben. Nach intraperitonealer oder intraluminaler Applikation von Kallikrein zeigte sich in unseren Versuchen in allen Darmabschnitten eine Steigerung der Mitoserate um mehr als das Doppelte. Rixon et al. (1963) fanden, daß sich die proliferationsfördernde Wirkung auf Knochenmark und Thymusgewebe auch in-vitro durch Bradykinin erzielen läßt, weshalb diese Autoren annehmen, daß der Kallikrein-Effekt indirekt durch Freisetzen von Kininen zustande kommt. Rabes (1975) arbeitete am Lebermodell und fand nach Teilhepatektomie und Injektion von radioaktiven DNS-Vorstufen unter Kallikreineinwirkung eine vermehrte Inkorporation markierter Substanzen in die Leberzellen. Ähnliches wurde auch von Matthiessen (1975) unter verschiedenen experimentellen Bedingungen beobachtet. Auch an Zellkulturen diploider, menschlicher Fibroblasten wurde nach Kallikrein-Einwirkung ein erhöhter Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die zelluläre DNS festgestellt (Schachtschabel und Rohen, 1975). Aufgrund zahlreicher verschiedenartiger Versuche nimmt Rabes an, daß Kallikrein bzw. die durch Kininogenasen freigesetzten Kinine an "empfindlichen" Stellen des Zellzyklus, und zwar entweder an der Grenze zwischen G_1 - oder S-Phase oder in der S-Phase selbst oder schließlich auch erst in der G_2 -Phase angreifen.

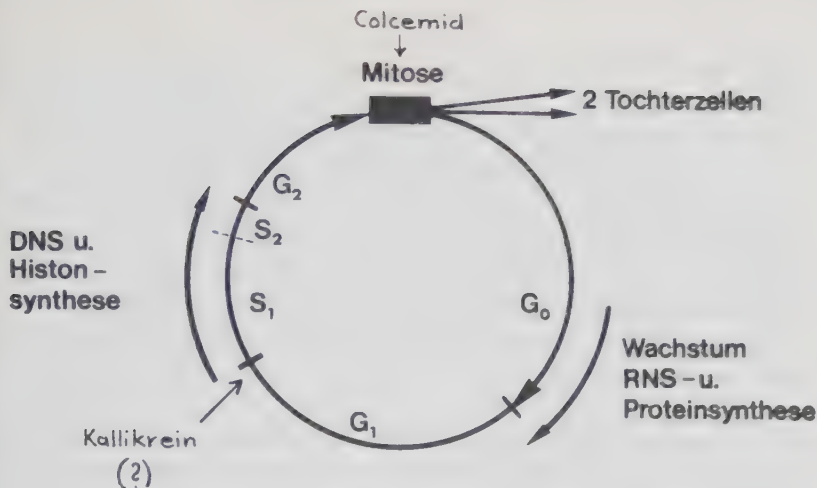


Abb. 11 Schematische Darstellung der verschiedenen Phasen des Zellzyklus (nach Koecke 1975) und die Möglichkeiten des Eingreifens der untersuchten Substanzen (Rot).

Eine vermehrte Inkorporation von DNS-Vorstufen fanden auch Schütte et al. 1975 in verschiedenen embryonalen Organen und Geweben der Ratte mit histoautoradiographischen Methoden. In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine Vermehrung der Mitosezahlen im Darmepithel, und zwar etwa in gleicher Größenordnung, auf zwei verschiedene Arten erzielt werden: a, durch Kallikreinapplikation und b, durch Gaben von Colcemid. Der Wirkungsmechanismus des Colchizins ist weitgehend bekannt. Die Substanz blockiert die Mikrotubuli des Spindelapparates und arretiert auf diese Weise die bereits in Gang befindlichen Mitosen in der Äquatorialplatte. Nach einer gewissen Zeit akkumulieren dann die nicht weiterdifferenzierten Zellen, so daß man dann im Kryptenepithel vermehrt Mitosen findet.

Demgegenüber ist der Wirkungsmechanismus des Kallikreins ein völlig anderer. Hier wird - was besonders die zitierten Befunde mit Radioisotopen zeigen - vermutlich die DNS-Synthese in den Zellen beschleunigt, so daß dann mehr Zellen in die G₂-Phase gelangen und damit zur Mitose ansetzen (Abb. 11). Auch auf diese Weise würden

dann nach einer gewissen Zeit im Darm mehr Mitosen zu finden sein, also die Zahl der Zellteilungen akkumulieren. Da die Darmepithelzellen wahrscheinlich keine längere G_0 -Phase durchmachen, läuft der Regenerationszyklus hier sowieso auf "Hochtouren" und kann über ein bestimmtes Maß hinaus nicht mehr gesteigert werden. Daher sind möglicherweise die Colcemid- und Kallikrein-effekte quantitativ nach oben begrenzt. Eine befriedigende Erklärung für diese Effekte läßt sich jedoch zur Zeit noch nicht geben.

Die Versuche mit Ausschaltung des exogenen Pankreas, das bekanntlich ein wichtiger Produzent von Kininogenasen ist, sollten einen reduzierten Ausgangszustand schaffen, um den Kallikrein-Effekt deutlicher hervortreten zu lassen. Nach Pankreasgangunterbindung wird die Mitoserate zunächst herabgesetzt, kann aber durch Kallikreininjektionen wieder erhöht werden. Diese Befunde sprechen dafür, daß auch am lebenden Organismus das Kallikrein-Kinin-System für die Unterhaltung des normalen Zellzyklus bei der Regeneration und Differenzierung des Darmepithels von Bedeutung ist und daß das Pankreas damit einen regulativen Einfluß auf das Funktionsgeschehen in der Darm-schleimhaut besitzt.

Zusammenfassung

Bei albinotischen Sprague-Dawley-Ratten wurde an histologischen Schnitten die Mitoserate in allen 4 Darmabschnitten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen untersucht. In der 1. Gruppe von Versuchen wurde die Wirkung von intraperitoneal bzw. intraluminal appliziertem Kallikrein in unterschiedlichen Dosen auf die Mitosehäufigkeit des Darmepithels bestimmt und festgestellt, daß Kallikrein, besonders im oberen Dünndarm, eine signifikante Erhöhung der Mitosezahlen hervorruft. In einer 2. Gruppe von Versuchen wurde dann geprüft, wie sich eine 8-18 Tage vor der Kallikreininjektion durchgeführte Ausschaltung des exokrinen Pankreas durch Pankreasgangunterbindung auf die Mitoserate des Darmepithels auswirkt. Es zeigte sich, daß nach Pankreasausschaltung die Mitoserate im Darm absinkt, sich aber durch Kallikreinapplikation in physiologischer Dosierung wieder steigern läßt.

In einer 3. Gruppe von Versuchen wurde schließlich den Tieren 1x bzw. bei länger dauernden Versuchen 2x ein Colchizinpräparat (Colcemid-Ciba) injiziert und dessen Effekt mit dem des Kallikreins verglichen.

Eine proliferationsfördernde Wirkung von Kallikrein wurde von Rixon et al. in Knochenmark und Thymus, von Schütte an embryonalen Geweben und von Mandel et al. an strahlengeschädigten Geweben nachgewiesen. Am Modell der Leberregeneration zeigte Rabes, daß radioaktiv markiertes Thymidin unter Kallikrein-Einfluß vermehrt in Hepatozyten eingebaut wird. Ähnliche Befunde über eine Stimulierung der Thymidin-Inkorporation in die DNS durch Kallikrein wurden auch an Zellkulturen menschlicher Fibroblasten erhoben (Schachtschabel und Rohen). Diese Ergebnisse und das Resultat der vorliegenden Untersuchung könnten deshalb so interpretiert werden, daß Kallikrein bzw. die durch Kallikrein freigesetzten Kinine über einen bisher unbekannten Mechanismus eine erhöhte DNS-Syntheserate bewirken, wodurch ein ver-

mehrtes Angebot von mitosebereiten Zellen entsteht, was dann im Verlauf der folgenden Stunden zu einer Erhöhung der Mitosezahlen führt. Da das exokrine Pankreas Kininogenasen in großer Menge produziert, darf man annehmen, daß diese Drüse auch normalerweise vermittels des Kallikrein-Kinin-Systems den raschen Zellzyklus im Darmepithel unterhält und steuert.

Schriftenverzeichnis

Altmann, G.B.: Influence of bile and pancreatic secretions on the size of the intestinal villi in the rat. Amer.J.Anat. 132: 167-177 (1971).

Clarke, R.M.: Mucosal architecture and epithelial cell production rate in the small intestine of the albino rat. J. Anat. 107: 519-529 (1970).

Erdős, E.G., A.F. Wilde (Eds.): Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. Handbook of exp. Pharm., vol. 25. Springer, Berlin 1970.

Fiedler, F., B. Müller, E. Werle: Active site titration of pig pancreatic kallikrein with p-nitrophenyl p⁻-guanidinobenzoate. FEBS Letters 24: 41-44 (1972).

Fiedler, F., Pig pancreatic kallikreins A and B. In: Methods in enzymology. Academic Press, New York 1975.

Frey, E.K., H. Kraut, E. Werle: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren. 2. Aufl. F.Enke Verlag, Stuttgart 1968.

Friedman, N.B.: Cellular dynamics in the intestinal mucosa: The effect of irradiation on the epithelial maturation and migration. J. exp. Med. 81: 553-558 (1945).

Fritz, H.: The Kallikrein-Kinin-System in Reproduktion-Biochemical Aspects. In: Kininogenases II, Stuttgart 1975

Haberland, G.L. and J.W. Rohen: Kininogenases, Kallikrein 1st Symposium, Mainz 1972

Haberland, G.L., J.W. Rohen, C. Schirren and P. Huber: Kininogenases, Kallikrein 2. Symposium, Mainz 1974

Koeber, H.U.: Allg. Biologie für Mediziner und Biologen. Schattauer Verlag, Stuttgart 1975.

Komiya, M., H. Kato, T. Suzuki: Structural comparison of high molecular weight and low molecular weight kininogen. J. Biochem. (Tokyo) 76: 833-845 (1974).

Kutzbach, C., G. Schmidt-Kastner: Kallikrein from pig pancreas. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 353: 1099-1106 (1972).

Leblond, C.P., C.E. Stevens, R. Bogorch: Histological localization of newly formed desoxyribonuclei acid Science. 108: 531-533 (1948).

Leblond, C.P., C.E. Stevens: The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat. Anat. Rec. 100: 357-377 (1948).

Leblond, C.P., B.E. Walker: Renewal of cell population. Physiol. Rev. 36: 255-275 (1956).

Mandel, P., C. Gary, F. Imbaud, J. Rodesch: Etude expérimentale de l'action de la Padutine dans le traitement des radiodermites et des radionécroses. Rapport Euratom, Eur 2151: 1-66 (1965).

Mandel, P., J.M. Mantz, M. Delemen, P. Michaelidis, J. Rodesch: Etude expérimentale du traitement des radiolésions par la padutine dépôt (Kallikreine). Rapport Euratom, Eur 2477: 1-21 (1966).

Mandel, P., J. Rodesch, J.M. Mautz: The treatment of experimental radiation lesions by Kallikrein. In: Kininogenases I, 171-187, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 1973.

Matthiessen, P.F., J.W. Rohen: H³-thymidine-incorporation into the testis of the albino rat after ligation of the pancreatic duct. In: Kininogenases II, 75-84, 1975, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 1975.

Moriwaki, Ch., H. Moriya, K. Yamaguchi, K. Kizuki, H. Fujimori: Intestinal absorption of pancreatic Kallikrein and some aspects of its physiological role. In: Kininogenases I, 57-66, 1973.

Moriya, H., Ch. Moriwaki, S. Akimoto, K. Yamazaki: Studies on Kallikreins, I. Chem.pharm.Bull. 15: 399 (1967); II. ibid. 15: 403 (1967).

Rabes, H.M.: Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver. In: Progress in liver diseases (H. Popper and F. Schaffner, eds.) Vol. V. Grune and Stratton, New York, 1975.

Rabes, H.M., H. Brändle: Synthesis of RNA, Protein, and DNA in the liver of normal and hypophysectomized rats after partial hepatectomy. Cancer Res. 29: 817 (1969).

Rabes, H.M., H.-V. Tuczek: Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie. Virchows Arch. Abt. B. Zellpath. 6: 302 (1970).

Rabes, H.M., B. Jantsch: Proliferationskinetik der Hepatocyten in primären Leberkulturen. Z. Zellforsch. 112: 414 (1971).

Rabes, H.M.: Influence of Kallikrein on Proliferation of Liver Cells in vivo and in vitro. In: Kininogenases III, 137-146, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 1975.

Riecken, E.O., R.Bloch, H.Menge, K. Idelberger, F.Kramer, B. Miller, H. Lorenz-Meyer: Morphologische und funktionelle Befunde nach Milchsäuredauerinfusion in das Jejunum der Ratte. Z. Zellforsch. 132: 107-129 (1972).

Rixon, R.H., J.F. Whitfield, J. Bayliss: The stimulation of mitotic activity in the thymus and bone Marrow of rats by Kallikrein. Horm. Metabol. Res. 3: 279-284, (1971).

Rixon, R.H., J.F. Whitfield: Kallikrein, Kinin and Cell Proliferation. In: Kininogenases I, 131-145, 1973, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York 1973.

Rohen, J.W.: Funktionelle Anatomie des Menschen. 2.Aufl., Schattauer Verlag, Stuttgart, 1975.

Schachtschabel, D.O. and J.W.Rohen: Influence of Kallikrein on ^3H -Thymidine Incorporation into DNA and on Glycolysis of Mammalian Cell Cultures. In: Kininogenases, 3. Internat. Symposium, Mainz 1975, Schattauer Verlag Stuttgart.

Schütte, B., J. Eggert, J. Lindner: The effect of Kallikrein on DNA content and synthesis of embryonic and post-embryonic tissues. In: Kininogenases III, 147-175, Schattauer Verlag, Stuttgart, 1975.

Stohlmann, F. (Edit.): The kinetics of cellular proliferation. New York 1959.

Tuczek, H.-V., H.M. Rabes: Autoradiographische und biochemische Untersuchungen zum Übertritt der Hepatocyten von der G1- in die S-Phase nach partieller Hepatektomie. Beziehungen zwischen Zellfluß, spezifischer Aktivität der DNA und Radioaktivität des niedermolekularen Pools nach ^3H -TdR-Markierung. Z.Zellforsch. 142: 399 (1973).

Wiebecke, B. et al.: Der Einfluß des Hungers auf die Proliferationskinetik der Dünn- und Dickdarmschleimhaut der Maus. Virchows Arch. Abt. B. Zellpath. 4, 164 (1969).

Zum Schluß möchte ich Herrn Professor Rohen für die Überlassung des Themas sowie die stets großzügige und intensive Unterstützung und Anleitung bei der Durchführung dieser Arbeit sehr herzlich danken.

Lebenslauf

Als zweite Tochter des Fabrikanten Karl-Hermann Hensiek und seiner Ehefrau Margret, geb. Ludwig wurde ich, Margit Hintz, geb. Hensiek, am 7.9.48 in Buer, Krs. Melle geboren.

Nach der Volksschule Buer besuchte ich das neusprachliche Gymnasium Melle, an dem ich 1967 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend besuchte ich die einjährige Betriebssekretärinnenklasse für Abiturientinnen in Essen.

Im WS 68/69 begann ich mit dem Medizinstudium in Marburg. Im Jahre 1970 heiratete ich den Arzt Dr. med. Matthias Hintz und bekam mein erstes Kind.

Mein gesamtes Medizinstudium absolvierte ich in Marburg und legte dort am 4. Juli 1975 die Ärztliche Prüfung ab. Nach Ableistung der Medizinalassistentenzeit an der Chirurgischen Universitätsklinik, der Medizinischen Universitäts-Poliklinik und in der anerkannten Landpraxis meines Mannes wurde mir am 11.8.76 die Approbation erteilt.

Im September 1976 bekam ich mein zweites Kind und arbeite jetzt wieder in der Praxis meines Mannes mit.

Meine akademischen Lehrer während des Medizinstudiums
waren die Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Aurich, Bommer, Buchholz, Dimroth,
Dehnecke, Dölle, Duven, Daume, Dams, Exner,
Engelhardt, Friederich, Ganz, Hamelmann,
Hort, Hardewig, Hensel, Hess, Heuser, Hamm,
Jacob, Knauf, Karlson, Koranski, Korb,
Koecke, Linneweh, Mann, Martini, Neurath,
Klaus, Kleinsasser, Petry, Pots, Rodeck,
Reim, Rohen, Rieken, Siegert, Seidel,
Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Uhlarik,
Walcher, Wendt.

